



UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTÀ DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in  
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

*Tesi di Laurea*

**Effetti dei canali al potassio calcio attivati IK e SK1-3  
sulla vitalità di cellule di melanoma cutaneo umano  
A375**

*Relatori*

Prof.ssa Paola Nieri

Dott.ssa Barbara Adinolfi

*Candidato*

Francesca Nencini

Anno Accademico 2011/2012

---

# Indice

<b>Capitolo 1.</b>	Introduzione	5
	1.1 I canali al potassio: ruolo funzionale in condizione fisiologiche e patologiche	5
	1.1.1 Classificazione e struttura dei canali al potassio	6
	1.1.2 Classificazione e struttura dei canali al potassio calcio attivati	10
	1.1.3 Ruolo fisiologico dei canali al potassio calcio attivati	18
	1.2 Canali al potassio e tumori	21
	1.2.1 Bloccanti e apritori dei canali IK e SK1-3	23
	1.2.2 Canali al potassio IK e SK1-3 nei tumori	26
	1.2.3 Canali al potassio calcio attivati nel melanoma cutaneo umano	30
<b>Capitolo 2.</b>	Scopo della ricerca	33
<b>Capitolo 3.</b>	Materiali e metodi	35

---

3.1	Materiali per gli studi funzionali	35
3.1.1	Farmaci e composti commerciali utilizzati	35
3.1.2	Linee cellulari	38
3.2	Materiali per gli studi di biologia molecolare	39
3.2.1	Oligo utilizzati	39
3.2.2	Kit e reagenti	41
3.3	Metodi utilizzati negli studi funzionali	42
3.3.1	Scongelo della linea cellulare	42
3.3.2	Mantenimento in coltura	43
3.3.3	Congelamento cellulare	44
3.3.4	Analisi della vitalità cellulare	46
3.4	Metodi utilizzati negli studi di biologia molecolare	49
3.4.1	Estrazione dell'RNA totale	49
3.4.2	Retrotrascrizione	52
3.4.3	PCR (Polymerase Chain Reaction)	53
3.4.4	Elettroforesi su gel di agarosio	56
<b>Capitolo 4.</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>57</b>
4.1	Profili di espressione ottenuti con RT-PCR per i canali IK e SK1-3	57
4.2	Valutazione dell'azione di CisPt e Temozolomide sulla vitalità cellulare	63

---

4.3 Valutazione dell'azione di bloccanti selettivi IK, Clotrimazolo e TRAM-34, sulla vitalità cellulare	66
4.4 Valutazione dell'associazione Clotrimazolo - Cisplatino sulla vitalità cellulare	69
4.5 Valutazione dell'azione del bloccante SK1-3 Apamina sulla vitalità di cellule A375	72
4.6 Valutazione dell'azione dell'attivatore non selettivo 1-EBIO sulla vitalità cellulare	73
<b>Capitolo 5. Conclusioni</b>	<b>75</b>
Abbreviazioni utilizzate nel testo	77
Bibliografia	79
Indice figure	84
Indice tabelle	86

## Capitolo 1

### Introduzione

#### ***1.1 I canali al potassio: ruolo funzionale in condizioni fisiologiche e patologiche***

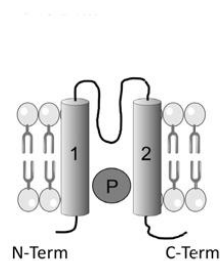
I canali al potassio costituiscono una vasta ed eterogenea famiglia di proteine codificate da più di ottanta geni e deputate al controllo del potenziale di membrana [Villalonga N. *et al.*, 2007]. I canali al potassio sono i canali ionici più diffusi presenti negli organismi viventi in cui regolano numerose funzioni; nelle cellule eccitabili regolano l'eccitabilità delle cellule stesse contribuendo così al mantenimento del potenziale d'azione, mentre nelle cellule non eccitabili controllano l'omeostasi del potassio e il volume cellulare [Girault A. *et al.*, 2012]. Sono inoltre implicati nella regolazione della secrezione ormonale, ad esempio nel rilascio di insulina dalle cellule  $\beta$  del pancreas, nell'apoptosi, nella immunomodulazione, nel differenziamento e nella proliferazione cellulare [Zhang L. *et al.*, 2008; Villalonga N. *et al.*, 2007; Felipe A. *et al.*, 2006]. Il malfunzionamento dei canali al potassio è alla base di diverse patologie quali disagi neurologici, cardiovascolari come aritmie, diabete e sindrome epilettica idiopatica [Shen Z. *et al.*, 2009]. Molti sottotipi di canali al potassio sono coinvolti con processi cellulari quali proliferazione e progressione del ciclo cellulare e la loro espressione risulta alterata in cellule tumorali rispetto alle corrispondenti sane [Villalonga N. *et al.*, 2007]. Per quanto riguarda il ruolo dei canali al potassio nella progressione tumorale è stato visto che un flusso anomalo delle correnti al potassio può influenzare processi cellulari quali proliferazione e differenziamento; inoltre, alcuni bloccanti e/o attivatori

hanno dimostrato di avere effetti anti-tumorali attraverso la diretta inibizione della crescita cellulare [Shen Z. *et al.*, 2009].

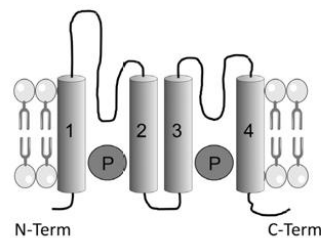
### 1.1.1 Classificazione e struttura dei canali al potassio

Sulla base delle sequenze aminoacidiche delle subunità che costituiscono i diversi canali al potassio è possibile classificare queste proteine in quattro classi (figura 1):

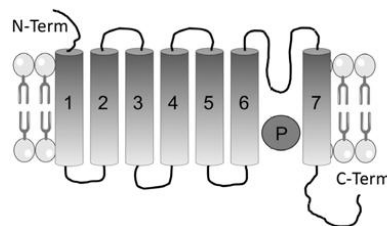
#### 2TS e 1P



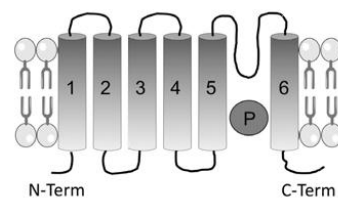
#### 4TS e 2P



#### 7TS e 1P



#### 6TS e 1P



**Figura 1.** Le quattro maggiori classi di canali al potassio [Girault A. *et al.*, 2012].

- Della prima di queste classi di canali al potassio fanno parte i canali con 2 segmenti transmembrana (2TS) e un dominio poro (1P) in cui le subunità  $\alpha$  sono associate in tetrameri a costituire il canale. Appartengono a questa classe i canali:
  - Kir (inwardly rectifying)
  - $K_{ATP}$  (ATP-sensibili)
  - $Kir_G$  (Kir attivati da proteina G)
- La seconda classe di canali al potassio comprende canali con quattro segmenti transmembrana (4TS) e due domini poro (2P) detti anche canali con domini poro in tandem; appartengono a questa classe i canali:
  - K2P
  - TWIN
  - TREK
  - TASK
  - TRAAK
- La terza classe di canali al potassio ha subunità  $\alpha$  con sette segmenti transmembrana (7TS) e un dominio poro (1P). A questa classe appartengono i canali  $BK_{ca}$  che, a differenza degli altri canali al potassio, hanno la porzione N-terminale sul lato extracellulare della membrana.
- La quarta ed ultima classe di canali al potassio ha subunità  $\alpha$  con sei segmenti transmembrana (6TS) e un dominio poro (1P) e le subunità  $\alpha$  sono associate in tetrameri a formare il canale funzionale. Il filtro di selettività per gli ioni potassio e il poro del canale si trovano nel *loop* tra il quinto e il sesto segmento transmembrana. Questa classe di canali comprende :
  - $K_v$  canali al potassio voltaggio attivati

---

-K<sub>ca</sub> canali al potassio calcio attivati

[Girault A. *et al.*, 2012]

I canali al potassio voltaggio e calcio attivati sono costituiti da quattro subunità  $\alpha$  che possono essere identiche a dare “omotetrameri” o diverse a dare “eterotetrameri”, alle quali possono o meno essere associate una o più subunità  $\beta$  accessorie. La subunità  $\alpha$  consiste di sei segmenti transmembrana indicati come S1-S6 in cui il segmento S4, per i canali Kv, costituisce il sensore del voltaggio e le eliche S5 e S6 delle quattro subunità  $\alpha$  sono assemblate a formare la regione del poro che consente la permeazione degli ioni potassio. I canali al potassio voltaggio attivati possono essere ulteriormente divisi in dodici sottofamiglie (Kv1 a Kv12) e sono espressi in molti tessuti tra cui: muscolo scheletrico, cuore, trachea, tratto gastrointestinale e ghiandole endocrine [Shen Z. *et al.*, 2009].

Le classi di canali al potassio sopra citate sono schematizzate per maggiore chiarezza in tabella 1.



Super-Family	Sub-Family	Subtype
<b>K<sub>v</sub></b>	<b>K<sub>v</sub>1-K<sub>v</sub>12</b>	K <sub>v</sub> 1.1
		K <sub>v</sub> 1.3
		K <sub>v</sub> 1.5
		K <sub>v</sub> 3.4
		K <sub>v</sub> 7.1
		K <sub>v</sub> 10.1
		K <sub>v</sub> 11.1
<b>K<sub>Ca</sub></b>	K <sub>Ca</sub> 1 K <sub>Ca</sub> 2 K <sub>Ca</sub> 3	K <sub>Ca</sub> 1.1
		K <sub>Ca</sub> 2.1
		K <sub>Ca</sub> 3.1
<b>K<sub>ir</sub></b>	<b>K<sub>ir</sub>1-K<sub>ir</sub>7</b>	K <sub>ir</sub> 2.1
		K <sub>ir</sub> 3.1
		K <sub>ir</sub> 4.1
		K <sub>ir</sub> 6
<b>K<sub>2P</sub></b>	<b>K<sub>2P</sub>1-7,9,10,12,13,15-17</b>	K <sub>2P</sub> 9.1

**Tabella 1.** Sottotipi di canali al potassio [Shen Z. *et al.*, 2009].

### 1.1.2 Classificazione e struttura dei canali al potassio calcio attivati

I canali al potassio calcio attivati sono canali al potassio sensibili a variazioni di calcio. Sulla base della loro conducibilità agli ioni potassio possono essere classificati in tre sottoclassi (Tabella 2):

- ◆ BK<sub>Ca</sub> larga conduttanza (100-300pS)
- ◆ IK<sub>Ca</sub> intermedia conduttanza (50-100pS) detti anche K<sub>Ca3.1</sub> o SK4
- ◆ SK<sub>Ca</sub> bassa conduttanza (8-20pS)

I canali al potassio calcio attivati a bassa conduttanza sono ulteriormente suddivisi in tre sottotipi:

K<sub>Ca2.1</sub> o SK1 codificati dal gene *KCNN1*

K<sub>Ca2.2</sub> o SK2 codificati dal gene *KCNN2*

K<sub>Ca2.3</sub> o SK3 codificati dal gene *KCNN3*

IUPHAR	HGNC	Other name
K <sub>Ca</sub> 1.1	<i>KCNMA1</i>	BKCa, canale Maxi-K
K <sub>Ca</sub> 2.1	<i>KCNN1</i>	SKCa1, hSK1, SK1
K <sub>Ca</sub> 2.2	<i>KCNN2</i>	SKCa2, hSK2, SK2
K <sub>Ca</sub> 2.3	<i>KCNN3</i>	SKCa3, hSK3, SK1
K <sub>Ca</sub> 3.1	<i>KCNN4</i>	SKCa4, hSK4, SK4, IKCa1, IK1

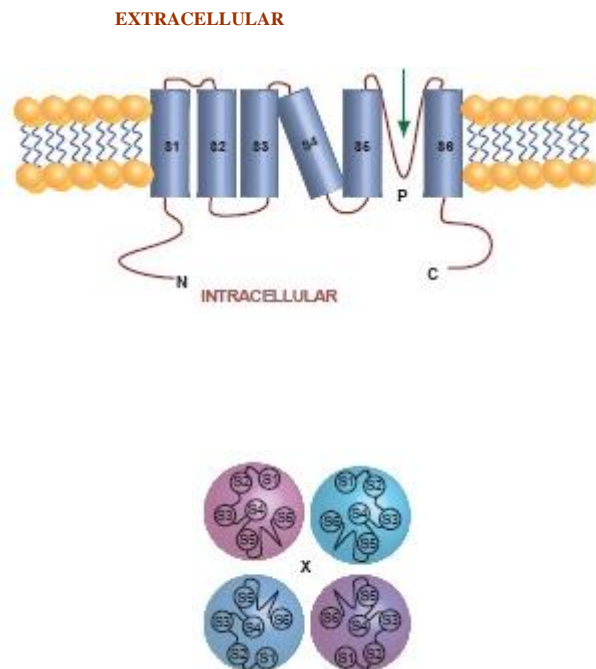
**Tabella 2.** Nomenclatura dei canali K<sub>Ca</sub> [Girault A. *et al.*, 2012].

I canali  $BK_{Ca}$  sono costituiti da dieci domini idrofobici (S1-S10) di cui S1-S6 sono segmenti transmembrana e le eliche S7-S10, localizzate nel citoplasma, costituiscono la regione di legame per gli ioni calcio. I canali  $SK_{Ca}$  posseggono invece solo sei domini transmembrana S1-S6 [Abdullaev F.I. *et al.*, 2009; Traut M.H. *et al.*, 2009; Shen Z. *et al.*, 2009] (Tabella 3).

Tipo di canale	Sottotipo	Conduttanza al potassio	Subunità ausiliarie
$BK_{Ca}$	Esistono numerosi prodotti dovuti a splicing alternativo	100-300pS	$\beta 1(KCNMB1)$ $\beta 2(KCNMB2)$ $\beta 3(KCNMB3)$ $\beta 4(KCNMB4)$
$IK_{Ca}$	$SK4 (KCNN4)$	50-100pS	Calmodulina (CaM)
$SK_{Ca}$	$SK1(KCNN1)$ $SK2(KCNN2)$ $SK3(KCNN3)$	8-20pS	Calmodulina (CaM)

**Tabella 3.** Canali al potassio calcio attivati e sottotipi [Wrzosek Antoni, 2009].

## Canali SK<sub>Ca</sub> e IK<sub>Ca</sub>

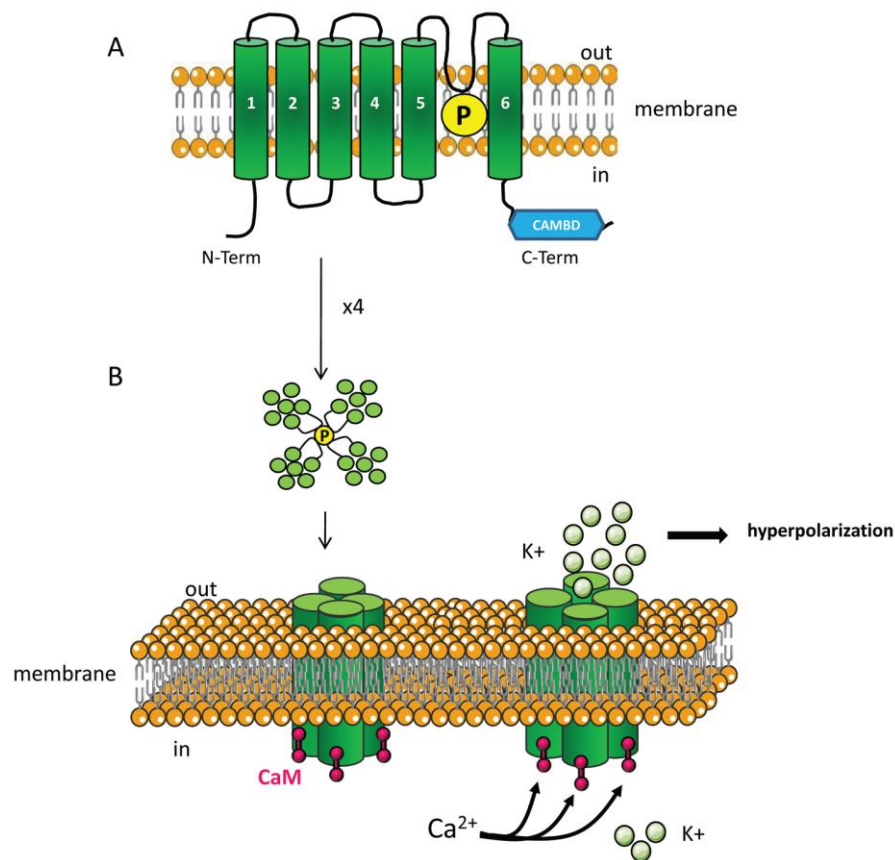


**Figura 2.** Rappresentazione dei segmenti transmembrana e dell'associazione delle subunità  $\alpha$  dei canali IK<sub>Ca</sub> e SK<sub>Ca</sub> [Bowden S. *et al.*, Tocris].

I canali SK<sub>Ca</sub> e IK<sub>Ca</sub> hanno una analogia strutturale come è possibile osservare in figura 2. Per questo motivo appartengono tutti alla superfamiglia dei canali “SK”. I canali SK sono codificati da quattro geni omologhi SK1-4 o *KCNN1-4* [Berkefeld H. *et al.*, 2010]. I geni SK1-3 codificano per i canali a piccola conduttanza SK1-3, mentre il gene SK4 codifica per il canale a intermedia conduttanza IK o SK4. E’ stato osservato che il sottotipo SK2 esiste in tre varianti SK2-S (short) SK2-L (long) e un’isoforma più piccola SK2-sh. Differiscono solo per la lunghezza del dominio intracellulare, con la variante SK2-L che ha 207 aminoacidi in più a livello dell’N-terminale. La terza variante SK2-sh è una variante di splice di SK2-S. La variante SK3 è caratterizzata dalla

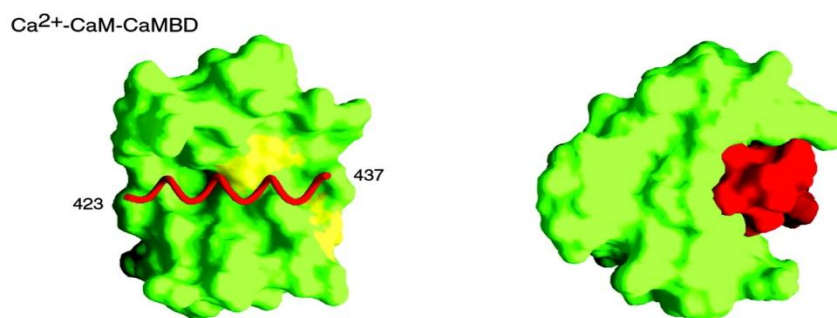
ripetizione di CAG (citosina-adenina-guanina) nella regione N-terminale che non ha un ruolo sulla localizzazione del canale ma sembra modificarne la conduttanza [Girault A. *et al.*, 2012].

Pur condividendo la struttura tetramerică dei sei domini transmembrana dei canali al potassio voltaggio attivati, manca la caratteristica tipica del segmento S4 sensore del voltaggio; di conseguenza l'apertura dei canali  $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$  è completamente indipendente dalla tensione transmembrana, anche a potenziali di membrana estremi. L'apertura e la chiusura di questi canali è dovuta solamente a cambiamenti nella concentrazione di calcio intracellulare; l'attivazione avviene in presenza di basse concentrazioni di calcio intracellulare ( $[Ca^{2+}] < 1\mu M$ ) [Berkefeld H. *et al.*, 2010; Girault A. *et al.*, 2012].



**Figura 3.** Struttura dei canali  $SK_{Ca}$  e legame alla Calmodulina (CaM) [Girault A. *et al.*, 2012].

I canali codificati dai geni *KCNN1-4* appartengono alla famiglia dei canali con sei segmenti transmembrana e un dominio poro. La porzione C-terminale costituisce il dominio di legame per la Calmodulina (CaM) (figura 3), proteina che influenza la sensibilità di questi canali al calcio [Girault A. *et al.*, 2012]. La Calmodulina è una piccola proteina acida multifunzionale di legame al calcio, identificata come un sensore esogeno per il calcio, ed altamente conservata nelle diverse specie. Questa proteina citoplasmatica consiste in una regione centrale che collega due domini globulari formati da NH<sub>2</sub>- e COOH-terminali. Ogni dominio globulare contiene due siti di legame per il calcio. Dopo il legame con il calcio, i domini globulari si riarrangiano piegando l'elica centrale di collegamento per formare una tasca idrofobica [Berkefeld H. *et al.*, 2010] (Figura 4).



**Figura 4.** Rappresentazione del complesso tra Ca<sup>2+</sup>-CaM-canale (Ca<sup>2+</sup>-CaM-CaMBD) [Wissmann R. *et al.*, 2001].

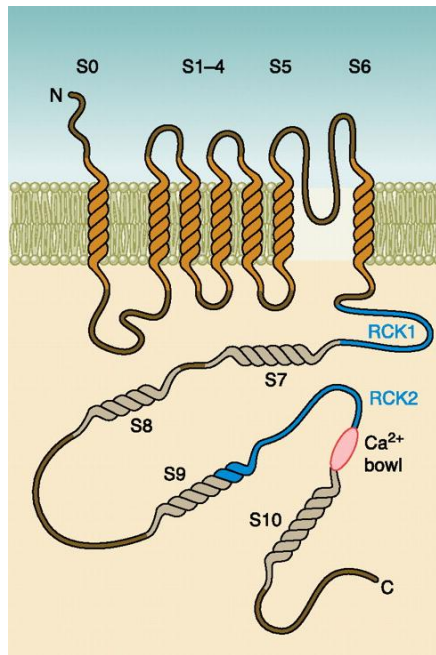
Il legame della Calmodulina ai canali aumenta notevolmente la loro affinità al calcio anche a basse concentrazioni nell'ordine del micromolare. I complessi CaM-SK sono altamente stabili, si formano spontaneamente *in vitro* e hanno importanza farmacologica, funzionale e strutturale [Berkefeld H. *et al.*, 2010]. La Calmodulina risulta anche implicata nella regolazione di numerosi eventi cellulari sia in condizioni fisiologiche che patologiche, tra cui la proliferazione cellulare. Antagonisti della Calmodulina come il Clotrimazolo, risultano inibire la

proliferazione cellulare anche in cellule di melanoma [Glass-Marmor L. and Beitner R., 1997].

Per i canali SK4 indicati anche IK, il legame della CaM con il C-terminale funge da sensore per il calcio e provoca l'apertura del canale in presenza di elevate concentrazioni di calcio [Joiner WJ. *et al.*, 2001].

### Canali BK<sub>Ca</sub>

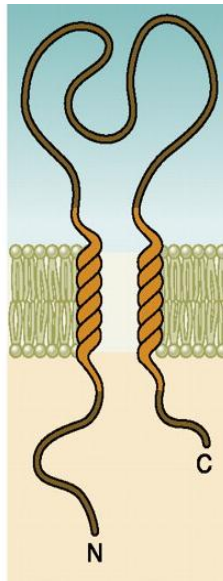
I canali BK<sub>Ca</sub> codificati da un singolo gene *Slo1*, *maxiK* o *KCNMA1* sono costituiti da una struttura tetramerica di subunità  $\alpha$  e risultano espressi in cellule eccitabili e non [Wrzosek Antoni, 2009]. I canali al potassio a larga conduttanza sono gli unici, tra tutti i canali al potassio, ad avere sette segmenti transmembrana S0-S7, in cui i segmenti S0-S6 presentano un corto NH2-terminale nel versante extracellulare della membrana e un COOH-terminale di grandi dimensioni, circa due terzi della proteina, nel versante intracellulare (Figura 5). Questa porzione intracellulare contiene quattro segmenti idrofobici S7-S10, due domini di regolazione della conduttanza al potassio, RCK1 e RCK2, e un tratto di residui di aspartato noti come “Ca<sup>2+</sup> Bowl”. La piegatura dei domini RCK 1-2 costituisce un sito di legame per il calcio che favorisce l'apertura del canale. L'altro elemento che induce l'apertura del canale è rappresentato dalla depolarizzazione della membrana attraverso modificazioni strutturali a livello dei segmenti S2-S4 [Berkefeld H. *et al.*, 2010].



**Figura 5.** Struttura dei canali BK<sub>Ca</sub> [Berkefeld H. *et al.*, 2010].

Sebbene i tetrameri di subunità  $\alpha$  che costituiscono i canali BK siano di per sé funzionali, la maggioranza dei canali BK<sub>Ca</sub> sono associati con subunità  $\beta$  ausiliarie (Figura 6). Si hanno quattro tipi di subunità  $\beta$  ausiliarie ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ) codificate da altrettanti geni *KCNMB1-4*. Le subunità  $\beta$  hanno due presunti segmenti transmembrana e un *loop* extracellulare che contiene siti di glicosilazione e residui di cisteina in grado di formare legami disolfuro. L' NH<sub>2</sub>-terminale e il COOH-terminale delle  $\beta$ -subunità sono localizzati entrambi nel versante intracellulare [Wrzosek Antoni, 2009].





**Figura 6.** Struttura delle subunità  $\beta$  dei canali  $BK_{Ca}$  [Berkefeld H. et al., 2010].

L'interazione tra le subunità  $\alpha$  e le subunità  $\beta$  coinvolge più siti di contatto: il primo dominio transmembrana della subunità  $\beta$  tocca i domini S1 e S2 della subunità  $\alpha$  e l'estensione extracellulare del secondo dominio transmembrana della subunità  $\beta$  entra in contatto con il segmento S0 della subunità  $\alpha$  [Berkefeld H. et al., 2010]. Le subunità  $\beta$  alterano le caratteristiche di attivazione dei canali  $BK_{Ca}$ . L'associazione con la subunità  $\beta 1$  incrementa fortemente la sensibilità al calcio dei canali  $BK_{Ca}$  in base ad un meccanismo allosterico che abbassa l'energia associata allo stato di apertura del canale; di conseguenza si verifica l'apertura del canale a potenziali più negativi e con cinetiche più rapide mentre la disattivazione del canale viene rallentata [Berkefeld H. et al., 2010].

### 1.1.3 Ruolo fisiologico dei canali al potassio calcio attivati

Come indicato in tabella 4 i canali al potassio calcio attivati sono abbondantemente espressi in vari tessuti tra cui :

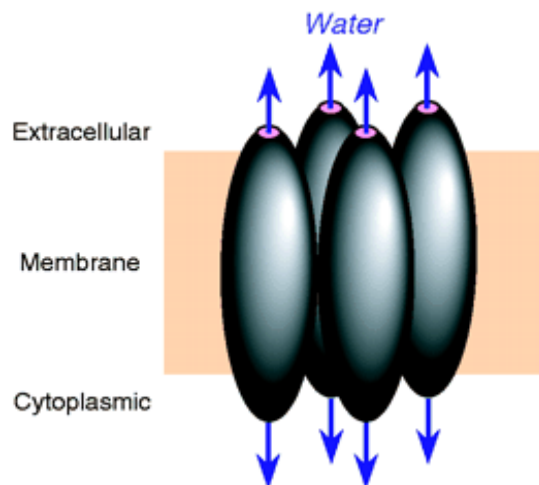
- ✓ Cuore
- ✓ Fegato
- ✓ Ovaie
- ✓ Cervello
- ✓ Rene
- ✓ Muscolo liscio
- ✓ Muscolo scheletrico
- ✓ Endotelio vascolare
- ✓ Osteoblasti

[Hirukawa K. *et al.*, 2008; Nagy N. *et al.*, 2009]

Canali al potassio calcio attivati	IK	SK1	SK2	SK3	BK
Espressione in condizioni fisiologiche	Cuore Fegato Ovaie Muscolo scheletrico Eritrociti Endotelio Muscolatura liscia	Cuore Fegato Ovaie SNC	Cuore Fegato Ovaie SNC	Cuore Fegato Ovaie SNC Muscolatura liscia uterina	Endotelio Ovaie Cuore SNC Tessuto osseo Muscolatura liscia Pancreas Ghiandola surrenale

**Tabella 4.** Espressione dei canali  $K_{Ca}$  in condizioni fisiologiche [Berkefeld H. *et al.*, 2010; Tharp D.L. and Bowles D. K., 2009; Weaver A.K. *et al.*, 2006; Nagy N. *et al.*, 2009; Burg E.D. *et al.*, 2006].

I canali al potassio sono coinvolti nella regolazione del volume cellulare dipendente in gran parte dai flussi ionici dall'ambiente intra ed extra cellulare. Tali flussi ionici a loro volta influenzano il trasporto passivo di acqua attraverso le acquaporine (Figura 7). Le acquaporine sono proteine strutturali espresse sulla superficie della cellula che formano canali specifici per il passaggio bidirezionale di acqua e piccoli soluti tra l'ambiente interno e quello esterno alla cellula. Ciò permette la regolazione del volume cellulare e il mantenimento dei normali gradienti di pressione idrostatica [Burg E.D. *et al.*, 2006; Verkman AS. *et al.*, 2005].



**Figura 7.** Struttura delle acquaporine [Verkman AS., *et al.*, 2005].

L'elevato gradiente di potassio è garantito dall'attività della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase o dall'attività della pompa del  $\text{Na}^+$  che espelle tre ioni sodio ogni 2 ioni potassio che entrano nella cellula, creando così variazione di voltaggio attraverso la membrana cellulare e un ambiente intracellulare con concentrazioni di ioni potassio elevate (140mM) e di ioni sodio molto inferiori (10mM). A riposo, la permeabilità cellulare al potassio è maggiore rispetto agli altri ioni, pertanto la permeabilità al

potassio è un importante regolatore del volume cellulare [Burg E.D. *et al.*, 2006].

I canali SK1-3 sono localizzati principalmente nei neuroni del SNC; gli SK2 si trovano anche in cellule sensoriali, microglia, vescica urinaria e miociti cardiaci; i canali SK3 sono espressi sia in cellule neuronali che gliali nonché in cellule endoteliali e della muscolatura liscia. Tutti e tre i sottotipi dei canali SK a livello del SNC, sono implicati nella regolazione dell'attività di molti neuroni, compresi i neuroni nocicettivi, importanti nella memoria e nell'apprendimento [Weaver A.K. *et al.*, 2006].

I canali IK si trovano in tessuti non neuronali come in cellule epiteliali, muscolari e del sangue [Berkefeld H. *et al.*, 2010].

Diversi studi hanno riscontrato i canali al potassio calcio attivati nelle cellule endoteliali, dei vasi sanguigni e linfatici e in minor misura nelle cellule del muscolo liscio [Feng J.*et al.*, 2008]. I canali al potassio calcio attivati presenti nella membrana plasmatica delle cellule endoteliali sono implicati nella vasodilatazione endotelio-dipendente e responsabili del mantenimento del potenziale di membrana di tali cellule. Un aumento della concentrazione di calcio intracellulare nelle cellule endoteliali è la prima risposta delle cellule a differenti stimoli ed è un fenomeno alla base della depolarizzazione della membrana [Wrzosek A., 2009].

A livello del fegato e nelle cellule biliari, sono stati identificati i canali  $IK_{Ca}$  e  $SK_{Ca}$  che vengono attivati da stress metabolico e aumento della secrezione di calcio. I colangiociti contribuiscono a mantenere il volume cellulare e la composizione della bile attraverso la regolazione della secrezione di elettroliti ed acqua. I canali al potassio calcio attivati sono molto importanti per la secrezione e la produzione della bile [Dutta A.K. *et al.*, 2009].

A livello delle ovaie, nelle cellule della granulosa, sono stati identificati i canali al potassio calcio attivati implicati nella produzione di ormoni sessuali steroidei [Traut M.H. *et al.*, 2009].

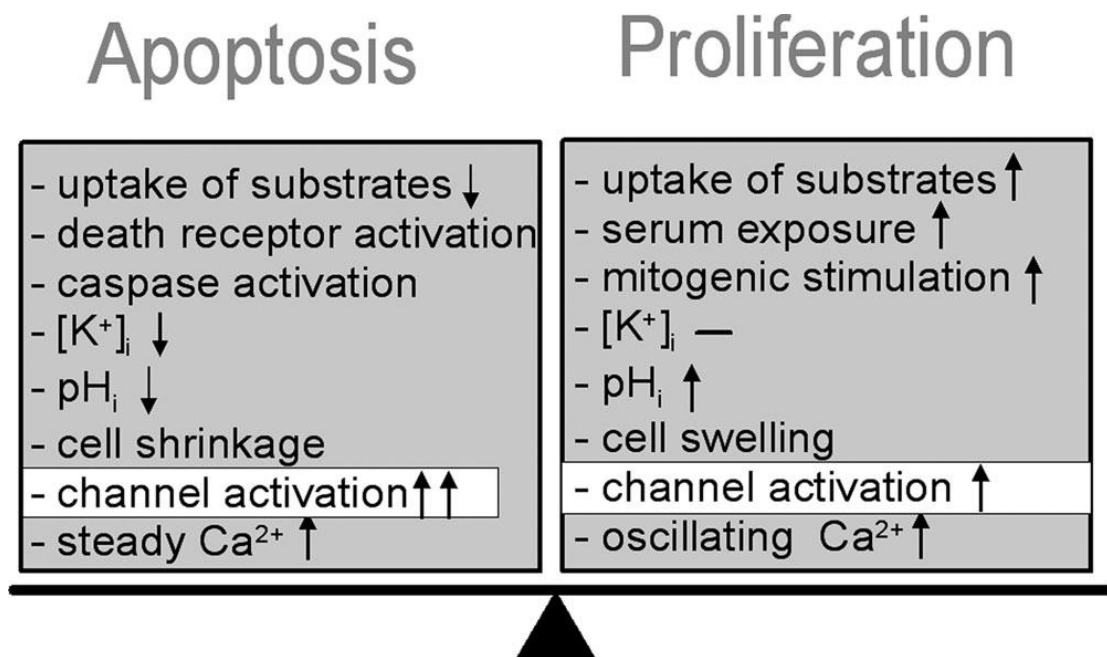
La mobilitazione del calcio intracellulare gioca un ruolo importante anche nella sopravvivenza, proliferazione e differenziamento cellulare, come è stato osservato negli osteoblasti, cellule del tessuto osseo la cui funzione è quella di produrre la matrice organica del tessuto osseo stesso. I canali  $BK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$  risultano espressi negli osteoblasti umani, implicati nella formazione del tessuto osseo, organo dinamico e vitale il cui metabolismo risulta controllato da un bilanciamento tra l'attività di osteoblasti e osteoclasti [Hirukawa K. *et al.*, 2008].

## ***1.2 Canali al potassio e tumori***

I canali al potassio risultano coinvolti in diversi processi quali proliferazione e migrazione di cellule tumorali. Recenti studi indicano un ruolo chiave dei canali al potassio nella progressione del ciclo cellulare e nell'apoptosi [Zhang L. *et al.*, 2009]. I canali al potassio calcio attivati sono sovraespressi in un considerevole numero di tumori come cancro alla prostata, seno, utero, gliomi e glioblastomi, colon, pancreas, stomaco e melanoma cutaneo [De Marchi U. *et al.*, 2009; Debska G. *et al.*, 2009; Abdullaev I.F. *et al.*, 2010; Kunzelmann K. *et al.*, 2005]. In alcuni casi il grado di malignità è correlato con l'espressione dei canali. In condizioni patologiche, come nel cancro, il processo di apoptosi è bloccato con conseguente iperplasia [Burg E.D. *et al.*, 2006]. La proliferazione cellulare porta ad un incremento del volume cellulare mentre l'apoptosi è caratterizzata da una diminuzione del volume cellulare e shrinkage cellulare, che rappresenta la caratteristica iniziale del processo di morte

cellulare programmata in diversi tipi di cellule [Wang Z., 2004] (figura 8). L'apoptosi è innescata da fattori che promuovono la morte cellulare come il ligando TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ); è un evento direttamente correlato ad una veloce attivazione delle correnti del potassio e perdita di potassio intracellulare. Successivamente vengono attivati enzimi metabolici come caspasi e nucleasi coinvolti nelle fasi precoci e tardive del processo apoptotico. L'attività di questi enzimi è notevolmente controllata dalla concentrazione di potassio intracellulare. L'efflusso di potassio e i processi di shrinkage cellulare possono essere regolati da diversi tipi di canali al potassio, alcuni dei quali sono anche localizzati nella membrana mitocondriale [Kunzelmann K., 2005].

L'efflusso del potassio durante l'apoptosi è maggiore rispetto a quello osservato durante l'attivazione dei canali nelle cellule tumorali. Un altro fattore di differenza tra proliferazione e apoptosi è dato dai segnali del calcio. Aumenti oscillatori di calcio sono associati con la proliferazione e non sono stati osservati nell'apoptosi anche se costanti aumenti di calcio sembrano essenziali per l'attivazione di enzimi apoptotici [Kunzelmann K., 2005].



**Figura 8.** Fattori che differiscono nei processi apoptosi e proliferazione cellulare [Kunzelmann K., 2005].

### 1.2.1 Bloccanti e apritori dei canali IK e SK1-3

Durante la trasformazione di una cellula sana in cellula tumorale, si verificano una serie di alterazioni genetiche che possono influenzare l'espressione dei canali ionici o causare un cambiamento nell'attività del canale. Una anomala attività del canale ionico è in grado di favorire la proliferazione del tumore [Kunzelmann K., 2005]. Dati in letteratura dimostrano che in presenza di bloccanti/apritori dei canali al potassio calcio attivati (Tabella 5) si verifica una variazione della proliferazione e della vitalità cellulare prevalentemente attraverso il blocco del ciclo cellulare [Felipe A. et al., 2006].

CANALI IK e SK1-3	APRITORI	BLOCCANTI
IK	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RILUZOLO</li> <li>• 1-EBIO</li> <li>• DC/EBIO</li> <li>• NS309</li> <li>• CLORZAXAZONE</li> <li>• CyPPA</li> <li>• NS4591</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CARIBDOTOSSINA (ChTX o CTX)</li> <li>• TRAM-34</li> <li>• CLOTRIMAZOLO</li> <li>• MAUROTOSSINA (MTX)</li> <li>• TETRAETILAMMONIO (TEA)</li> <li>• NS8593</li> <li>• NS11757</li> <li>• 4-AMINOPIRIDINA</li> <li>• UCL1559</li> <li>• BARIO</li> <li>• CHINIDINA</li> <li>• VERAPAMIL</li> <li>• TETRAPENTILAMMONIO</li> <li>• IMIPRAMINA</li> </ul>
SK1-3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CLORZAXAZONE</li> <li>• RILUZOLO</li> <li>• 1-EBIO</li> <li>• DC/EBIO</li> <li>• NS309</li> <li>• CKII</li> <li>• CyPPA</li> <li>• GW542573X</li> <li>• NS4591</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• APAMINA</li> <li>• DEQUALINIO CLORURO</li> <li>• TETRAETILAMMONIO (TEA)</li> <li>• UCL1684</li> <li>• EDELFOSSINA</li> <li>• NS8593</li> <li>• NS11757</li> <li>• 4-AMINOPIRIDINA</li> <li>• BARIO</li> <li>• CHINIDINA</li> <li>• VERAPAMIL</li> <li>• TETRAPENTILAMMONIO</li> <li>• UCL1848</li> <li>• CARIBDOTOSSINA (ChTX o CTX)</li> </ul>

**Tabella 5.** Bloccanti e apritori dei canali IK e SK1-3 [Wrzosek Antoni, 2009; Traut M. H. *et al.*, 2009; Girault A. *et al.*, 2012; Berkefeld H. *et al.*, 2010; Jäger H. *et al.*, 2003; Felipe A. *et al.*, 2006; Dunn P.M., 1998; Wang Zhiguo, 2004; Wuff H. *et al.*, 2000; De Marchi U. *et al.*, 2009; Roy JW *et al.*, 2009; Potier M. *et al.*, 2010; Lee L. E., *et al.*, 2008; Dutta K. A. *et al.*, 2009; Abullaev F. I. *et al.*, 2010; Weaver A. K. *et al.*, 2006; Gavrilo-Ruch O. *et al.*, 2002; Palmer L.M. *et al.*, 2007; Wulff H: *et al.*, 2001].



Gli apritori dei canali  $K_{Ca}$  ad oggi più studiati sono:

- GW542573X 4-(2-methoxy-phenylcarbamoyloxymethyl)-piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester) attivatore selettivo per SK1-3 ed essenzialmente inattivo sui canali IK con un profilo di selettività che segue l'ordine  $SK1 > SK2 = SK3 > IK$
- 1-EBIO (1-ethyl-2-benzimidazolinone), DC-EBIO, riluzolo, NS309 hanno limitata selettività per SK ma elevata affinità per IK e il loro profilo di selettività segue l'ordine  $IK > SK1 = SK2 = SK3$
- CyPPA( cyclohexyl-[2-(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)-6-methyl-pyrimidin-4-yl]-amine) attivatore selettivo per SK2 e SK3 con un profilo di affinità  $SK3 > SK2 >> SK1 = IK$

Questi composti possono rappresentare degli strumenti utili per le indagini volte a definire i ruoli di tali canali in condizioni fisiologiche e non. Inoltre, dati della letteratura, riportano che gli attivatori 1-EBIO CyPPA e NS309 agiscono attraverso il legame Calmodulina/C-terminale attivando il canale e aumentando l'affinità per il calcio. Per questo motivo possono essere definiti come modulatori allosterici positivi. L'apritore GW542573X agisce invece attraverso la Ser<sup>293</sup> sul segmento transmembrana S5 influenzando i processi di apertura del canale [Hougaard C. *et al.*, 2009].

Per quanto riguarda i bloccanti dati in letteratura indicano che quelli maggiormente utilizzati sono:

- Apamina selettivo per SK
- TRAM-34 e Clotrimazolo IK selettivi
- Edelfosina SK selettivo
- Caribdotossina non selettivo
- TEA bloccante dei canali al potassio non selettivo

Questi composti hanno la capacità di inibire la proliferazione e la vitalità cellulare [Wrzosek Antoni, 2009; Traut M. H. *et al.*, 2009; Girault A. *et al.*, 2012; Berkefeld H. *et al.*, 2010; Jäger H. *et al.*, 2003].

### 1.2.2 Canali IK e SK1-3 nei tumori

L'inibizione dell'espressione dei canali  $K_{Ca}$  o il blocco con inibitori selettivi riduce la proliferazione cellulare delle cellule tumorali [Kunzelmann K., 2005]. E' stato osservato che l'incubazione con bloccanti specifici induce una riduzione dell'afflusso di calcio con conseguente morte cellulare. Questa evidenza può essere parzialmente la ragione della crescita di cellule tumorali indotta da una anormale espressione dei canali (iperespressione) dato che i livelli di calcio intracellulare regolano segnali di trasduzione cellulare che comprendono mitosi e crescita cellulare. L'attivazione dei canali al potassio iperpolarizza la membrana cellulare e incrementa la forza per l'afflusso del calcio regolando così il percorso di crescita cellulare dipendente dal calcio [Shen Z. *et al.*, 2009]. In Tabella 6 sono indicati i sottotipi di canali al potassio calcio attivati (IK e SK1-3) e la loro espressione in diversi tipi di tumori.

Canali IK e SK1-3	Espressione nel cancro
<b>IK</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancro prostata</li> <li>• Cancro pancreatico (linee cellulari BxPC-3, PANC-1, MiaPaCa-2)</li> <li>• Cancro colon (HTC116)</li> <li>• Cancro seno (MCF-7)</li> <li>• Glioblastoma (GBM62 , GBM50)</li> <li>• Melanoma</li> <li>• Cancro endometriale</li> <li>• Leucemia (K562)</li> <li>• Osteosarcoma (linee cellulari SaOS-2, HOS, MG-63)</li> </ul>
<b>SK1-3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glioblastoma (linee cellulari U251-MG, D54-MG) (SK2-SK3)</li> <li>• Cancro seno (linee cellulari MDA-MB-435s) (SK3)</li> <li>• Melanoma</li> </ul>

**Tabella 6.** Espressione dei canali IK e SK1-3 in differenti tipi di cancro [Sciaccaluga M. *et al.*, 2010; Weaver A.K. *et al.*, 2006; Abdullaev F.I. *et al.*, 2010; Jager H. *et al.*, 2003; Hirukawa K. *et al.*, 2008; Roy JW *et al.*, 2009; Zhang L. *et al.*, 2008; Potier M. *et al.*, 2010].

Dati in letteratura indicano che:

- Linee cellulari di Gliomi e glioblastomi U251, GL15, U251MG, GBM62, GBM50, U251, U87-MG e D54-MG esprimono i canali IK assenti invece in cellule non tumorali del SNC, e i canali SK. Si ha una sovraespressione dei canali SK2 e SK3 nelle linee cellulari U87 e U251 rispetto ai canali SK1. L'uso di Clotrimazolo e/o TRAM-34 inibisce nettamente la proliferazione cellulare in diverse linee cellulari di glioma e glioblastoma multiforme; il bloccante selettivo UCL1848, testato sulle linee U87 e U251, risulta non avere effetti sulla crescita tumorale [Abdullaev F.I. *et al.*, 2010]. Da studi effettuati sulle linee cellulari GL15 e U251, emerge che i canali IK risultano implicati nella migrazione cellulare dove l'attivazione dei canali risulta cruciale durante l'invasione delle cellule del parenchima cerebrale. La chemochina

CXCL12 che richiede l'attività dei canali IK, induce migrazione cellulare nel glioblastoma e il blocco dei canali IK con specifici inibitori abolisce completamente la migrazione cellulare indotta da tale chemochina [Sciaccaluga M. *et al.*, 2010; Weaver A.K. *et al.*, 2006; Abdullaev F.I. *et al.*, 2010].

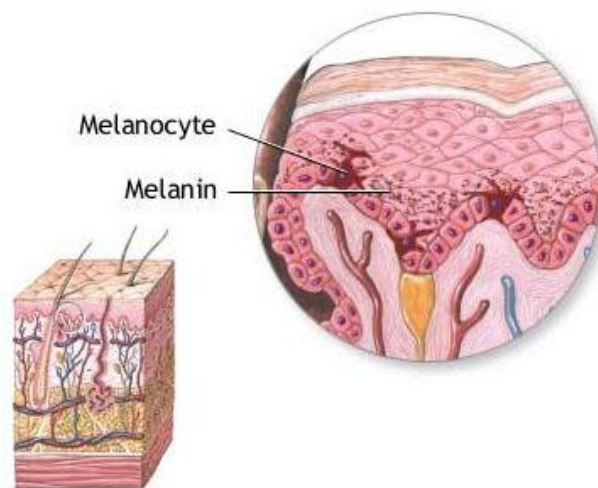
- Sulla linee cellulari di cancro al pancreas BxPC-3, PANC-1 e MiaPaCa-2, Clotrimazolo e TRAM-34, bloccanti selettivi per i canali IK, inibiscono la crescita cellulare solo sulle linee MiaPaCa-2 e BxPC-3 ma non sulla linea PANC-1. Questa evidenza può dipendere dal fatto che nella linea PANC-1 non è essenziale la presenza di calcio per la progressione del ciclo cellulare e dal fatto che l'espressione dei canali IK risulta più bassa rispetto alle altre due linee cellulari [Jager H. *et al.*, 2003].
- In linee cellulari di osteosarcomi MG-63, SaOS-2 e HOS, i canali IK risultano moderatamente espressi; i canali SK1 sono espressi nella linea HOS; i canali SK2 sono presenti sia nella linea MG-63 che nella linea HOS mentre i canali SK3 sono espressi in tutte e tre le linee cellulari di osteosarcoma umano [Hirukawa K. *et al.*, 2008].
- Nella linea cellulare di adenocarcinoma mammario MCF-7 risultano espressi i canali IK e gli effetti del bloccante TRAM-34 sulla proliferazione cellulare dipendono dalla concentrazione testata. E' stato visto che a concentrazioni relativamente basse, intorno a 10 $\mu$ M, il composto provoca un incremento della proliferazione cellulare, mentre a concentrazioni fino a 100 $\mu$ M induce diminuzione di proliferazione [Roy JW *et al.*, 2009].

Nella linea cellulare MDA-MB-435s di cancro al seno risultano altamente espressi i canali SK2 e SK3; il bloccante selettivo Edelfosina riduce la migrazione cellulare attraverso una diminuzione dell'attività dei canali e dell'entrata di calcio nella cellula. I canali SK3 hanno effetti sulla migrazione ma non sulla proliferazione cellulare [Zhang L. *et al.*, 2008; Potier M. *et al.*, 2011].

### 1.2.3 Canali al potassio calcio attivati e melanoma cutaneo umano

Una causa della malignità del cancro è l'abilità delle cellule tumorali di diffondere da tumori primari a tumori secondari in siti distanti da quello di origine. Prima di dare luogo a metastasi, le cellule tumorali dapprima invadono i tessuti adiacenti per poi passare attraverso il sangue e i vasi linfatici che permettono la loro diffusione in siti distanti. Alcuni processi meccanici come adesione, motilità cellulare e vari eventi molecolari governano la diffusione delle cellule tumorali. La comprensione dei meccanismi alla base della formazione delle metastasi è utile per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche. Questo è particolarmente importante per il melanoma cutaneo ampiamente refrattario alle attuali terapie [Chantome A. *et al.*, 2009].

Le cellule di melanoma cutaneo originano dalle cellule epidermiche preposte alla sintesi di melanina: i melanociti



**Figura 9.** Rappresentazione schematica del melanocita [National Cancer Institute].

Studi effettuati sul melanoma cutaneo, il tumore più aggressivo tra le neoplasie maligne che colpiscono la pelle, indicano un ruolo dei canali al potassio calcio attivati, in particolare di IK e SK1-3, nel controllo della crescita e progressione tumorale anche se ad oggi risultano pochi gli studi effettuati su tale tipologia tumorale. L'espressione di questi sottotipi di canali è mostrata in numerose linee cellulari di melanoma cutaneo umano (Tabella 7) e le linee più studiate risultano essere SKmel-28, 518A2, IGR1, IGR39, IPC298 [Meyer R. *et al.*, 1999; Girault A. *et al.*, 2012; Tajima N. *et al.*, 2011 ]. Per quanto riguarda i canali BK<sub>Ca</sub> nel melanoma cutaneo, dalla letteratura risultano poco studiati e la loro espressione è stata evidenziata solo nella linea cellulare di melanoma IGR39 [Tajima N. *et al.*, 2011]. Per questo motivo questo sottotipo di canale è stato momentaneamente escluso dalle indagini e nell'ambito di questo elaborato di tesi è stata focalizzata l'attenzione sui sottotipi IK e SK1-3.

Canali $K_{Ca}$	Espressione in linee cellulari di melanoma cutaneo umano
<b>IK</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IGR1</li> <li>• C8161</li> <li>• C8146</li> <li>• SKMEL28</li> <li>• IGR39</li> <li>• IPC298</li> <li>• KB-3-1</li> </ul>
<b>SK1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IGR1</li> <li>• C8161</li> <li>• C8146</li> <li>• SKMEL28</li> <li>• IGR39</li> <li>• IPC298</li> </ul>
<b>SK2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IGR1</li> <li>• C8161</li> <li>• C8146</li> <li>• SKMEL28</li> <li>• 518A2</li> <li>• HBL</li> <li>• Bris</li> <li>• IGR39</li> <li>• IPC298</li> </ul>
<b>SK3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C8161</li> <li>• C8146</li> <li>• SKMEL28</li> <li>• 518A2</li> <li>• HBL</li> <li>• Bris</li> </ul>
<b>BK</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IGR39</li> </ul>

**Tabella 7.** Canali  $K_{Ca}$  e loro espressione nel melanoma cutaneo umano [Lepple-Wienhues A., 1996; Allen D.H. *et al.*, 1996; Nilius B. and Wohlrab W., 1992; Chantome A. *et al.*, 2009; Gavrilova-Ruch O. *et al.*, 2002; Tajima N. *et al.*, 2011; Meyer R. *et al.*, 1999; Tajima N. *et al.*, 2006; Lee L. E. *et al.*, 2008].



## Capitolo 2

### Scopo della ricerca

I canali al potassio calcio attivati sono ampiamente espressi in diversi organi e tessuti e sono responsabili di un'ampia varietà di processi cellulari che vanno dalla regolazione del tono della muscolatura liscia, alla modulazione della neurotrasmissione, al controllo neuronale [Berkefeld H. *et al.*, 2010]. Molti canali al potassio svolgono un ruolo nel controllo della proliferazione e progressione del ciclo cellulare e la loro espressione risulta spesso aumentata in cellule tumorali rispetto alle corrispondenti sane. Dati in letteratura evidenziano che specifici bloccanti dei canali  $K_{Ca}$ , riducendo il flusso di potassio calcio-dipendente, inducono morte cellulare in cellule tumorali di diversa origine [Shen Z. *et al.*, 2009, Villalonga N. *et al.*, 2007].

Uno dei tumori la cui incidenza è in continuo aumento negli ultimi anni e altamente refrattario alle classiche chemioterapiche è il melanoma cutaneo; per questa neoplasia cresce sempre più la necessità di disporre di nuove strategie terapeutiche.

Ad oggi, non sono molti i dati in letteratura relativi al ruolo svolto dai canali al potassio calcio attivati nel melanoma cutaneo [Taijma N. *et al.*, 2006; Lepple-Wienhues A. *et al.*, 1996]

Alla luce di quanto detto, scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di verificare l'espressione dei canali IK e SK1-3 sulla linea cellulare di melanoma cutaneo umano A375 e di indagare molecole note bloccanti e/o apritori come agenti in grado di modulare l'attività dei canali presi in

esame, con il tentativo di stabilire se i canali al potassio calcio attivati possono essere considerati come nuovi target terapeutici per tale neoplasia.